



⑬ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 101 61 577 A 1**

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 07 K 14/00**  
C 07 K 1/00

⑲ Aktenzeichen: 101 61 577.9  
⑳ Anmeldetag: 14. 12. 2001  
㉑ Offenlegungstag: 3. 7. 2003

DE 101 61 577 A 1

⑦① Anmelder:  
Scil Proteins GmbH, 06120 Halle, DE  
  
⑦④ Vertreter:  
PAe Reinhard, Skuhra, Weise & Partner GbR, 80801  
München

⑦② Erfinder:  
Oschmann, Jan, 06667 Weißenfels, DE;  
Grauschopf, Ulla, Zürich, CH; Kuntzsch, Antje,  
06114 Halle, DE; Rudolph, Rainer, 06120 Halle, DE

⑤⑥ Entgegenhaltungen:  
Amersham Pharmacia Biotech Data file: Affinity  
chromatography HiTrap Chelating 1 ml and 5 ml  
18-1134-78 AB, S.1-6 05.2000.;  
YEH,S.R., ROUSSEAU,D.L.: Hierarchical folding of  
cytochrome c. 2000. In: Nature Structural Biology,  
Vol.7, S.443-445;

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verfahren zur Renaturierung von Proteinen

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von substituierten Imidazoliumsalzen zur Renaturierung, zur Verminderung der Aggregation und/oder zur Erhöhung der thermischen Stabilität von Proteinen sowie ein Verfahren zur Renaturierung von Proteinen, zur Verminderung der Aggregation und/oder zur Erhöhung der thermischen Stabilität von Proteinen sowie renaturierte Proteine, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden die zu behandelnden Proteine mit einem flüssigen Renaturierungsmedium, welches substituierte Imidazoliumsalze enthält, in Kontakt gebracht.

DE 101 61 577 A 1

[0001] Die Erfindung betrifft die Verwendung von substituierten Imidazoliumsalzen zur Renaturierung, zur Verminderung der Aggregation und/oder zur Erhöhung der thermischen Stabilität von Proteinen sowie ein Verfahren zur Renaturierung, zur Verminderung der Aggregation und/oder zur Erhöhung der thermischen Stabilität von Proteinen sowie renaturierte Proteine, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden.

[0002] Unter Renaturierung von Proteinen wird in diesem Zusammenhang die Gewinnung oder Wiederherstellung der biologischen Aktivität und/oder der weitgehend korrekten Faltung von Proteinen angesehen. Dem Problem der Proteinrenaturierung kommt in der Biotechnologie eine große Bedeutung zu. Aufgrund der Entwicklungen in der Molekularbiologie ist es möglich, Proteine, ausgehend von deren codierenden Sequenzen zu klonieren und rekombinant in Wirtsorganismen zu produzieren. Hierbei fallen die rekombinanten Proteinen allerdings häufig als biologisch inaktive Aggregate, an. Das in den inclusion bodies enthaltene Protein muß anschließend durch Renaturierung in vitro in die biologisch aktive Form überführt werden.

[0003] Diese Renaturierung ist ein sehr komplexer strukturebiologischer Prozeß, der häufig nur in sehr geringen Ausbeuten an nativem Protein mündet. Bereits Steigerungen der Ausbeute an renaturiertem Protein von wenigen Prozent stellen daher eine wesentliche Verbesserung und einen wirtschaftlichen Vorteil dar.

[0004] Bei der in vitro Faltung von inclusion body Proteinen beobachtet man meist eine kinetische Konkurrenz zwischen der korrekten Faltung und unproduktiven Nebenreaktionen wie Fehlfaltung und Aggregation. Die Aggregationsprozesse beruhen meist auf hydrophoben Wechselwirkungen der weitgehend entfalteten Polypeptidketten oder nicht-nativer, partiell gefalteter Intermediate. Unabhängig von ihrer molekularen Ursache weisen diese Aggregationsprozesse eine Reaktionsordnung von  $> 2$  auf. Dementsprechend erhöht sich die Geschwindigkeit der unproduktiven Aggregationsreaktionen bei Erhöhung der Konzentration der entfalteten Polypeptidkette. Da die korrekten Faltungsprozesse meist durch Reaktionen erster Ordnung bestimmt werden, bedeutet dies, dass die Aggregationsreaktionen bei Erhöhung der Konzentration an denaturiertem Protein über die korrekte Faltung dominieren. Aus diesem Grund werden in vitro Faltungsreaktionen meist bei sehr niedriger Proteinkonzentration durchgeführt. Zusätzlich müssen physikalische Parameter wie pH, Ionenstärke, Redoxsystem und Temperatur für die Renaturierung von Proteinen optimiert werden. Allerdings führt auch dies häufig nicht zu dem gewünschten Erfolg.

[0005] Weiterhin ist schon seit langem bekannt, dass Pufferzusätze wie Harnstoff oder Guanidin in nicht denaturierender Konzentration einen positiven Einfluß auf die Faltungseffizienz haben können. Als Alternative zu Guanidin oder Harnstoff wurden auch andere chaotrope Stoffe wie Alkylharnstoff oder organische Cosolvenzien wie beispielsweise Carbonsäureamide oder alkylierte Amine bei in vitro Faltungsprozessen verwendet.

[0006] Im Falle der Renaturierung von humanem Gewebsplasminogenaktivator aus *E. coli* inclusion bodies wurde beobachtet, dass die Ausbeute bei der in vitro Faltung durch Zusatz von L-Arginin gesteigert werden kann. Weitere Studien haben gezeigt, dass auch bei der in vitro Faltung anderer Proteine wie Antikörperfragmente oder Immunotoxine die Faltungseffizienz durch L-Arginin verbessert werden kann. Obgleich Arginin eine Guanidinogruppe enthält,

wirkt es nicht so stark strukturstabilisierend wie Guanidin. Dementsprechend erhöht Arginin vermutlich die Löslichkeit von entfalteten Polypeptidketten oder von Faltungsintermediaten, ohne dass es die native Proteinstruktur signifikant destabilisiert. Weitere Additive zur Erhöhung der in vitro Faltungseffizienz sind hochkonzentrierte Tris-Puffer, Polyethylenglycol oder Detergenzien. Durch Verwendung gemischter Mizellen (beispielsweise aus Triton X 100 und Phospholipiden) wurden ebenfalls verbesserte Faltungsausbeuten erzielt. Diese gemischten Mizellen enthalten sowohl polare als auch unpolare Gruppen, die vermutlich durch Wechselwirkungen mit Faltungsintermediaten deren Aggregation unterdrücken.

[0007] Trotz einer Vielzahl von in der Literatur angegebenen Protokollen zur Renaturierung von Proteinen ist die industrielle Nutzung dieser Technik noch nicht weit vorangeschritten. Die Gründe hierfür liegen sowohl in den technischen als auch biochemischen Schwierigkeiten. Da auch unter optimalen Bedingungen die Renaturierung von Proteinen nur bei sehr niedrigen Proteinkonzentrationen möglich ist, erfordert eine industrielle Produktion die Aufarbeitung sehr großer Renaturierungsvolumen. Darüber hinaus ist auch unter optimierten Bedingungen die Renaturierungseffizienz vieler Proteine nur gering.

[0008] Aufgabe der Erfindung ist daher die Identifizierung von Substanzen, die die Effizienz der Proteinfaltung in vitro steigern und ein Verfahren bereitzustellen, mit dem Proteine effektiv und in größerer Ausbeute als bisher renaturiert werden können.

[0009] Gelöst wird diese Aufgabe erfindungsgemäß durch die Verwendung von substituierten Imidazoliumsalzen zur Renaturierung, zur Verminderung der Aggregation und/oder zur Erhöhung der thermischen Stabilität von Proteinen sowie durch ein Verfahren zur Renaturierung, zur Verminderung der Aggregation und/oder zur Erhöhung der thermischen Stabilität von Proteinen, bei dem die zu behandelnden Proteine mit einem flüssigen Medium, welches substituierte Imidazoliumsalze enthält, in Kontakt gebracht werden. Die vorliegende Erfindung betrifft auch Proteine, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden.

[0010] Die bevorzugte erfindungsgemäße Verwendung ist die Verwendung zur Renaturierung von Proteinen.

[0011] Unter Verminderung der Aggregation ist erfindungsgemäß zu verstehen, dass die Aggregation von Proteinen, die üblicherweise bei längeren Aufbewahrungszeiträumen in flüssigen Medien auftritt und womit ein Verlust oder eine Verminderung der biologischen Funktionsfähigkeit einhergeht, vermindert oder sogar weitgehend verhindert wird.

[0012] Unter Erhöhung der thermischen Stabilität ist erfindungsgemäß zu verstehen, dass die biologische Aktivität bzw. die korrekte Proteinfaltung auch bei Temperaturen bis weit oberhalb Raumtemperatur über längere Zeit beibehalten werden kann.

[0013] Bei den erfindungsgemäß verwendeten Imidazoliumsalzen handelt es sich bevorzugt um bei Raumtemperatur ionische Flüssigkeiten. Falls es sich nicht um bei Raumtemperatur flüssige Verbindungen handelt, sollten die erfindungsgemäßen Imidazoliumsalze zumindest bei den Behandlungsbedingungen in flüssiger Form vorliegen und/oder in dem flüssigen Medium löslich sein. Bei den im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendeten Imidazoliumsalzen ist die positive Ladung der organischen Komponente mit dem Ringsystem assoziiert und üblicherweise und bevorzugt in dem Imidazoliumring delokalisiert.

[0014] Das Verfahren beruht auf der überraschenden Entdeckung, dass substituierte Imidazoliumsalze die Aggregation von Proteinen unterdrücken und die Effizienz der Renaturierung steigern. Bisher wurden diese organischen Salze

lediglich als Lösungsmittel in der organischen Synthese und der Zwei-Phasen-Katalyse eingesetzt, ein Einfluss auf strukturbildende Prozesse in der Biochemie war bislang unbekannt. Auch für andere organische Salze ist beschrieben worden, dass sie eine effizientere Renaturierung von Proteinen ermöglichen, wie z. B. 3-(1-Pyridinio)-1-propansulfat oder Trigonellin-Hydrochlorid (WO 99/18196). Diese Substanzen weisen bspw. keine delokalisierte positive Ladung im heterocyclischen Ringsystem auf. Im direkten Vergleich ihrer Wirkung auf die Renaturierung von Proteinen weisen die Imidazoliumderivate der vorliegenden Erfindung eine deutlich höhere Effizienz auf (vgl. auch die Ausführungsbeispiele sowie Abb. 2 und 3 mit Abb. 8 und 9).

[0015] Es ist bevorzugt, dass die Imidazoliumringe der Imidazoliumsalze der vorliegenden Erfindung durch Alkyl-, Alkenyl-, Aryl- und/oder Aralkyl-Reste substituiert sind, welche wiederum durch funktionelle Gruppen substituiert sein können, bspw. durch Stickstoff-, Schwefel-, und/oder Phosphor-haltige Gruppen, wobei verschiedene Oxidationsstufen möglich sind. Erfindungsgemäß bevorzugte Beispiele für diese funktionellen Gruppen sind: Amin-, Carboxyl-, Carbonyl-, Aldehyd-, Hydroxy-, Sulfat-, Sulfonat- und/oder Phosphatgruppen.

[0016] Erfindungsgemäß können ein oder beide N-Atome des Imidazoliumrings durch gleiche oder unterschiedliche Substituenten substituiert sein. Vorzugsweise sind beide Stickstoffatome des Imidazoliumrings durch gleiche oder unterschiedliche Substituenten substituiert.

[0017] Es ist erfindungsgemäß auch möglich und bevorzugt, dass die Imidazoliumsalze zusätzlich oder ausschließlich an einem oder weiteren der Kohlenstoffatome des Imidazoliumrings substituiert sind.

[0018] Als Substituenten kommen bevorzugt C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkylreste in Frage, z. B. Methyl-, Ethyl-, n-Propyl-, Isopropyl-, n-Butyl und/oder Isobutylreste, besonders bevorzugt Ethyl- und/oder Methylreste. Ebenfalls bevorzugte Substituenten sind C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-Alkenylreste, wie Ethylen-, n-Propylen, Isopropylen, n-Butylen und/oder Isobutylen. Bei diesen C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkylresten und C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-Alkenylresten weisen die erfindungsgemäßen Imidazoliumverbindungen eine erfindungsgemäß besonders geeignete Wasserlöslichkeit auf, die bei längeren Alkyl- oder Alkenylketten abnimmt. Die Wasserlöslichkeit kann aber durch löslichkeitsfördernde Substituenten an den Alkyl- oder Alkenylketten wiederum verbessert werden, bspw. durch Sulfat-, Sulfonat-, Amino- oder Phosphatreste. Erfindungsgemäß sind auch Alkyl und Alkenylsubstituenten mit mehr als 4 C-Atomen umfasst, wobei bspw. C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl- oder Alkenylsubstituenten ebenfalls noch bevorzugt sind. Diese C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl- oder Alkenylreste sind weiterhin bevorzugt, wenn sie ein oder mehrere weitere Substituenten an den Alkyl- und/oder Alkenylgruppen aufweisen, wie Phosphat-, Sulfonat-, Amino- und/oder Phosphatgruppen.

[0019] Als Arylsubstituenten sind erfindungsgemäß mono- und/oder bicyclische Arylreste bevorzugt, Phenyl, Biphenyl und/oder Naphthalin sowie Derivate dieser Verbindungen mit Hydroxy-, Sulfonat-, Sulfat-, Amino-, Aldehyd-, Carbonyl- und/oder Carboxygruppen. Beispiele für bevorzugte Arylsubstituenten sind Phenol, Biphenyl, Biphenol, Naphthalin, Naphthalincarbonsäuren, Naphthalinsulfonsäuren, Biphenylole, Biphenylcarbonsäuren, Phenol, Phenylsulfonat, und/oder Phenolsulfonsäuren.

[0020] Bevorzugte Aralkylreste sind Benzyl- oder substituierte Benzylreste.

[0021] Es ist besonders bevorzugt, dass der Imidazoliumring an mindestens einem N-Atom einen Methylrest aufweist.

[0022] Die erfindungsgemäß verwendeten Imidazolium-

salze sind bevorzugt Flüssigkeiten, d. h. es handelt sich bevorzugt um bei Raumtemperatur (ca. 25°C) ionische Flüssigkeiten. Es können jedoch ebenso bei Raumtemperatur nicht flüssige Imidazoliumsalze verwendet werden, die aber bei den Renaturierungsbedingungen in flüssiger Form vorliegen sollten bzw. in dem flüssigen Medium löslich sein sollten.

[0023] Als anionische Gegenionen für die substituierten Imidazoliumringe sind erfindungsgemäß insbesondere Halogene und halogenhaltige Ionen geeignet. Besonders bevorzugt sind dabei Chlorid und Tetrafluorborat. Weiterhin bevorzugt sind Phosphat, Sulfat und Isocyanat.

[0024] Erfindungsgemäß besonders bevorzugt verwendbare Imidazoliumsalze sind: 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat, 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-chlorid, 1-Butyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat.

[0025] Erfindungsgemäß können bevorzugt die nachfolgenden Proteinklassen und/oder Proteine renaturiert werden, deren thermische Stabilität erhöht werden und/oder deren Aggregation vermindert werden bzw. die nachfolgenden Proteine und/oder Proteinklassen können in dem erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugt eingesetzt werden:

Proteasen, bevorzugt Serin-Proteasen, insbesondere Thrombin, Faktor Xa, Caspasen, Cathepsine, Trypsin und Chymotrypsin, Cystein-Proteasen, saure Proteasen, wie Pepsin oder Rennin, Metallo-Proteasen, wie Thermolysin; Proteaseinhibitoren, bevorzugt Pepstatine, Antipain, Chemostatine, Elastinal, Leupeptine, Bestatin, Antithrombin III;

DNA-bindende Proteine, bevorzugt Transkriptionsfaktoren, insbesondere NF- $\kappa$ B und Mitglieder der Familien Jun, Fos, Krox, Myc, E2F; virale T-Antigene;

virale Proteine, z. B. virale Hüllproteine, Kapsidproteine, virale Proteasen, Polymerasen und/oder T-Antigene;

Phosphatasen;

Proteinkinasen, bevorzugt Tyrosinkinasen und/oder Serinkinasen;

Proteine der Immunglobulin-Superfamilie, z. B. Antikörper und Fragmente hiervon;

Wachstumsfaktoren, z. B. epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Erythropoietin, Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren I und II (IGF I und IGF II), Interleukin-2 (IL-2), Nervenwachstumsfaktor (NGF), transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und/oder Thrombocyten-Wachstumsfaktor (PDGF) sowie von diesen Proteinen abgeleitete Proteine und Fragmente.

[0026] Erfindungsgemäß können disulfidfreie und disulfidverbrückte Proteine renaturiert werden und/oder deren thermische Stabilität verbessert und/oder deren Aggregation verhindert bzw. vermindert werden. Besonders bevorzugt können Mehrdomänenproteine und komplex disulfidverbrückte Proteine behandelt werden wie z. B. Lysozym, rPA (rekombinanter Plasminogenaktivator, Handelsname Replase),  $\alpha$ -Glucosidase, Antikörper und von ihnen abgeleitete Fragmente und/oder Wachstumsfaktoren. Diese Proteine/Proteinklassen dienen lediglich als Beispiele, die Erfindung ist jedoch nicht auf diese Liste beschränkt.

[0027] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Renaturierung, zur Verminderung der Aggregation und/oder zur Erhöhung der thermischen Stabilität von Proteinen wird als flüssiges Medium bevorzugt ein für das zu behandelnde Protein geeignetes Puffersystem eingesetzt. Als Puffersubstanzen sind Tris, Hepes, Mes, Mops, Acetat, Glycin und/oder Phosphat bevorzugt einsetzbar, wobei die Pufferkonzentration in dem flüssigen Medium bevorzugt 10-1000 mM, bevorzugter 5-200 mM, ebenfalls bevorzugt 10-200 mM und weiterhin bevorzugt 10-50 mM beträgt. Der pH-Wert des Puffersystems beträgt vorzugsweise 4-11, weiterhin bevorzugt 7,5-10,5. Für Lysozym beträgt der pH-Wert bei der Re-

naturierung vorzugsweise etwa 8, und für die Renaturierung von rPA beträgt der pH-Wert vorzugsweise etwa 10,5. Für andere zu renaturierende Proteine können die Pufferzusammensetzungsparameter individuell angepaßt und optimiert werden, so dass eine maximale Ausbeute an renaturiertem Protein erhalten wird.

[0028] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren Renaturierung von Proteinen erfolgt das Inkontaktbringen der zu renaturierenden bzw. zu behandelnden Proteine mit dem flüssigen Medium bevorzugt, indem das zu behandelnde Protein mit dem flüssigen Medium verdünnt, dialysiert und/oder dialtriert wird. Grundsätzlich sollte bei einer Renaturierung eine Umpufferung des denaturierten Proteins in den Renaturierungspuffer gewährleistet sein.

[0029] Beim Inkontaktbringen, insbesondere bei der Renaturierung, beträgt die Proteinkonzentration des zu behandelnden Proteins bevorzugt 5-500 µg/ml, bevorzugt 10-100 µg/ml, noch bevorzugter ungefähr 50-100 µg/ml. Diese Werte können von einem Fachmann für das jeweilige zu renaturierende bzw. zu behandelnde Protein an die Löslichkeitseigenschaften des Proteins angepasst werden.

[0030] Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich zur Renaturierung von disulfidfreien und disulfidverbrückten Proteinen. Dabei werden disulfidfreie Proteine bevorzugt in Gegenwart eines Reduktionsmittels, wie DTT, DTE und/oder Cystein, bevorzugt in einer Konzentration von 1-10 mM, mit dem Renaturierungsmedium, welches substituierte Imidazoliumsalze enthält, in Kontakt gebracht.

[0031] Bei der Renaturierung disulfidverbrückter Proteine werden diese bevorzugt in Gegenwart eines Redoxsystems aus reduzierten und oxidierten Thiolsubstanzen wie DTT, DTE, Glutathion, Cystein, Mercaptoethanol, bevorzugt in einer Konzentration von 1-10 mM, in Kontakt gebracht. Die Konzentrationsverhältnisse von reduzierten Substanzen zu oxidierten Substanzen ("reduziert: oxidiert") betragen dabei vorzugsweise 1:10 bis 20:1, bevorzugt 1:5-10:1, weiterhin bevorzugt 1:1 bis 5:1.

[0032] Die Konzentration an substituierten Imidazoliumsalzen beträgt beim Inkontaktbringen, insbesondere bei der Renaturierung, bezogen auf das Renaturierungsmedium, bevorzugt 5-95 Vol.-%, weiterhin bevorzugt 5-50 Vol.-%, weiterhin bevorzugt 10-40 Vol.-%. Auch hier kann die optimale Konzentration für das jeweilige Protein durch einfache Versuche ermittelt werden. Üblicherweise ergibt der Zusatz von substituierten Imidazoliumsalzen in einem Anteil von 10-40 Vol.-% die besten Renaturierungsausbeuten. Wie bereits erwähnt, kann jedoch, abhängig von den jeweils eingesetzten Imidazoliumverbindungen, die Konzentration bis zu 95 Vol.-% betragen.

[0033] Die Renaturierungsdauer beträgt üblicherweise bevorzugt: 0,1-100 h, weiterhin bevorzugt 1-50 h, noch bevorzugter ungefähr 2-20 h.

[0034] Die Renaturierung erfolgt vorzugsweise bei niedrigen Temperaturen von 0-37°C, bevorzugt 5-15°C, da bei höheren Temperaturen die Aggregationsreaktionen zunehmen.

[0035] Als Parameter der Optimierung der Renaturierung können bevorzugt die biologische Aktivität des Proteins und das Aggregationsverhalten über den Prozeßverlauf gemessen werden.

[0036] In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann das Protein pulsweise mehrfach hintereinander oder kontinuierlich dem Renaturierungspuffer zugegeben werden.

[0037] Insgesamt ist das erfindungsgemäße Verfahren besonders vorteilhaft zur Renaturierung von Proteinen geeignet. Dabei ist es weiterhin bevorzugt, dass das flüssige Medium für die Renaturierung von Proteinen neben den substi-

tuieren Imidazoliumsalzen weitere bekannte Renaturierungssubstanzen oder die Renaturierung unterstützende Substanzen enthält, wie z. B. Harnstoff, Guanidin, L-Arginin, Alkylharnstoff, Carbonsäureamide, alkylierte Amine, Tris-Puffer, Polyethylenglykol und/oder Detergenzien.

[0038] Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen beschrieben. Dabei wird auf die folgenden Figuren Bezug genommen:

[0039] Fig. 1 zeigt die Renaturierungsausbeute in % für Lysozym in Abhängigkeit von der Konzentration an 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat;

[0040] Fig. 2 zeigt die Renaturierungsausbeute von rPA in Abhängigkeit von der Konzentration an 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat;

[0041] Fig. 3 zeigt die Renaturierungsausbeute von rPA in Abhängigkeit von der Konzentration an 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-chlorid;

[0042] Fig. 4 zeigt die Renaturierungsausbeute von rPA in Abhängigkeit von der Konzentration an 4-Methyl-N-butylpyridinium-tetrafluorborat;

[0043] Fig. 5 zeigt die Renaturierungsausbeute von rPA in Abhängigkeit von der Konzentration an 1-Butyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat;

[0044] Fig. 6 ist eine graphische Darstellung der Aggregation von rPA während der Renaturierung, bestimmt mittels Lichtstreuung, wobei 0% und 5% 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat, enthalten sind.

[0045] Fig. 7 ist eine graphische Darstellung des Aggregationsverhaltens von rPA in Abhängigkeit der Temperatur und für verschiedene Konzentrationen an 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat, bestimmt mittels Lichtstreuung;

[0046] Fig. 8 zeigt die Renaturierungsausbeute von rPA in Abhängigkeit von der Konzentration an 3-(1-Pyridinio)-1-propanesulfat;

[0047] Fig. 9 zeigt die Renaturierungsausbeute von rPA in Abhängigkeit von der Konzentration an Trigonellin-hydrochlorid;

#### Beispiel 1

##### Denaturierung von Proteinen

[0048] Lysozym, rPA oder inclusion body Proteine werden mit einer Proteinkonzentration von 0,5-20 mg/ml in 0,1 M Tris, pH 8, 6 M Guanidinhydrochlorid, 1 mM EDTA, 200 mM DTT für mindestens 2 h bei Raumtemperatur denaturiert und reduziert. Anschließend wird der pH-Wert durch Zugabe von HCl auf ca. pH 2 abgesenkt. Wahlweise kann das denaturierte Protein gegen das 1000fache Volumen 6 M Guanidinhydrochlorid, pH 2 dialysiert werden. Die Konzentration des denaturierten Proteins wird mit Hilfe des Bradford-Assay (Bradford, 1976) oder spektroskopisch bestimmt. Hierfür wird für rPA ein Extinktionskoeffizient von  $\epsilon(1 \text{ mg/ml}, 280 \text{ nm}, 1 \text{ cm}) = 1$  und für Lysozym  $\epsilon(1 \text{ mg/ml}, 280 \text{ nm}, 1 \text{ cm}) = 2,37$  verwendet.

#### Beispiel 2

##### Renaturierung von Lysozym

[0049] Die Renaturierung von Lysozym erfolgt durch eine 1:100 Verdünnung des denaturiert, reduzierten Proteins in den auf 10°C vortemperierten Renaturierungspuffer, die Endkonzentration des Proteins beträgt 200 µg/ml. Als Renaturierungspuffer wird 0,05 M Tris, pH 8, 1 mM EDTA, 4 mM GSSG (oxidiertes Glutathion) und unterschiedliche Konzentrationen der ionischen Flüssigkeit 1-Ethyl-3-me-

thyl-imidazolium-tetrafluorborat eingesetzt. Als Reduktionsmittel dient 2 mM DTT, welches durch die Verdünnung aus dem Denaturierungsansatz eingeschleppt wird. Nach der Renaturierung werden die Proben gegen das 1000fache Volumen von 0,05 M Tris, pH 8, 1 mM EDTA über Nacht dialysiert. Als Maß der Renaturierung wird die Enzymaktivität von Lysozym photometrisch gemessen und anhand einer Eichgerade quantifiziert.

[0050] In Fig. 1 ist die Abhängigkeit der Renaturierungsausbeute von Lysozym von der Konzentration des Salzes 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat dargestellt. In Gegenwart von 10–15 Vol.-% 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat kann Lysozym quantitativ, also zu 100%, oxidativ renaturiert werden.

#### Beispiel 3

Renaturierung von rPA mittels 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat

[0051] Die Renaturierung des in 6 M Guanidin, pH 2 befindlichen rPA erfolgt durch eine 1 : 100 Verdünnung in 0,1 M Tris, pH 10,5, 1 mM EDTA, 5 mM GSSG, 2 mM GSH (reduziertes Glutathion) in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von 1-Ethyl-3-methylimidazolium-tetrafluorborat. Die Renaturierung wird für mindestens 16 h bei 10°C durchgeführt. Nach der Renaturierung werden die Proben gegen das 1000fache Volumen von 0,1 M Tris, pH 8, 1 mM EDTA über Nacht dialysiert. Als Maß der Renaturierung wird die Enzymaktivität von rPA mit Hilfe des Chromozym-tPA-Assays (Roche Diagnostics) ermittelt und anhand einer Eichgerade für das native rPA quantifiziert.

[0052] In Fig. 2 ist die Renaturierungsausbeute von rPA in Abhängigkeit von der Konzentration des Salzes 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat dargestellt. Die Renaturierungsausbeute liegt bei 23% in Gegenwart von 20–30 Vol.-% 1-Ethyl-3-methyl-imidazoliumtetrafluorborat.

#### Beispiel 4

Renaturierung von rPA mittels 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-chlorid

[0053] Die Renaturierung des in 6 M Guanidin, pH 2 befindlichen rPA erfolgt durch eine 1 : 100 Verdünnung in 0,1 M Tris, pH 10,5, 1 mM EDTA, 5 mM GSSG, 2 mM GSH in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-chlorid. Die Renaturierung wird für mindestens 16 h bei 10°C durchgeführt. Nach der Renaturierung werden die Proben gegen das 1000fache Volumen von 0,1 M Tris, pH 8, 1 mM EDTA über Nacht dialysiert. Als Maß der Renaturierung wird die Enzymaktivität von rPA mit Hilfe des Chromozym-tPA-Assays (Roche Diagnostics) ermittelt und anhand einer Eichgerade für das native rPA quantifiziert.

[0054] In Fig. 3 ist die Renaturierungsausbeute von rPA in Abhängigkeit von der Konzentration des Salzes 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-chlorid dargestellt. Die Renaturierungsausbeute liegt bei 26% in Gegenwart von 20–25 Vol.-% 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-chlorid.

#### Beispiel 5

Renaturierung von rPA mittels 4-Methyl-N-butyl-pyridinium-tetrafluorborat (Vergleichsbeispiel)

[0055] Die Renaturierung des in 6 M Guanidin, pH 2 be-

findlichen rPA erfolgt durch eine 1 : 100 Verdünnung in 0,01 M Tris, pH 10,5, 1 mM EDTA, 5 mM GSSG, 2 mM GSH in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von 4-Methyl-N-butyl-pyridinium-tetrafluorborat. Die Renaturierung wird für mindestens 16 h bei 10°C durchgeführt. Nach der Renaturierung werden die Proben gegen das 1000fache Volumen von 0,1 M Tris, pH 8, 1 mM EDTA über Nacht dialysiert. Als Maß der Renaturierung wird die Enzymaktivität von rPA mit Hilfe des Chromozym-tPA-Assays (Roche Diagnostics) ermittelt und anhand einer Eichgerade für das native rPA quantifiziert.

[0056] In Fig. 4 ist die Renaturierungsausbeute von rPA in Abhängigkeit von der Konzentration des Salzes 4-Methyl-N-butyl-pyridinium-tetrafluorborat dargestellt. Mit steigender Konzentration an 4-Methyl-N-butyl-pyridinium-tetrafluorborat steigt die Renaturierungsausbeute von rPA. Bei einer Konzentration von 94% (v/v) 4-Methyl-N-butyl-pyridiniumtetrafluorborat liegt die Ausbeute an renaturiertem rPA bei 13,5%.

#### Beispiel 6

Renaturierung von rPA mittels 1-Butyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat

[0057] Die Renaturierung des in 6 M Guanidin, pH 2 befindlichen rPA erfolgt durch eine 1 : 100 Verdünnung in 0,1 M Tris, pH 10,5, 1 mM EDTA, 5 mM GSSG, 2 mM GSH in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von 1-Butyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat. Die Renaturierung wird für mindestens 16 h bei 10°C durchgeführt. Nach der Renaturierung werden die Proben gegen das 1000fache Volumen von 0,1 M Tris, pH 8, 1 mM EDTA über Nacht dialysiert. Als Maß der Renaturierung wird die Enzymaktivität von rPA mit Hilfe des Chromozym-tPA-Assays (Roche Diagnostics) ermittelt und anhand einer Eichgerade für das native rPA quantifiziert.

[0058] In Fig. 5 ist die Renaturierungsausbeute von rPA in Abhängigkeit von der Konzentration des Salzes 1-Butyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat dargestellt. Die Renaturierungsausbeute liegt bei 8% in Gegenwart von 20% (v/v) 1-Butyl-3-methyl-imidazoliumtetrafluorborat.

#### Beispiel 7

Aggregation von rPA während der Renaturierung

[0059] Die Renaturierung des in 6 M Guanidin, pH 2 befindlichen rPA erfolgt durch eine 1 : 100 Verdünnung in 0,1 M Tris, pH 10,5, 1 mM EDTA, 5 mM GSSG, 2 mM GSH in An- oder Abwesenheit von 5% 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat. Die Reaktion wird bei 10°C in einer rührbaren Fluoreszenzküvette durchgeführt. Während der Kinetik wird die Aggregation des Proteins durch Messung der Lichtstreuung bei 360 nm Anregung und 360 nm Emission aufgezeichnet.

[0060] In Fig. 6 ist der pufferkorrigierte Plateauwert der Aggregationsmessungen von der rPA-Renaturierung in Abwesenheit des Salzes (offener Balken) und in Gegenwart von 5% Vol.-% 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat (gefüllter Balken) dargestellt. In Gegenwart von mindestens 5 Vol.-% 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat wird die Aggregation des zu renaturierenden rPA's nahezu vollständig unterdrückt.

## Thermische Stabilität von rPA

[0061] Natives rPA in einer Konzentration von 20 µg/ml in 0,1 M Tris, pH 10,5, 1 mM EDTA, 5 mM GSSG, 2 mM GSH in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat wird mit einer Heizrate von ca. 0,3°C/min von 20°C bis 90°C aufgeheizt. Während dieses Vorganges wird der Aggregationszustand des Proteins mittels Lichtstreuung analysiert. Hierzu wird die Probe in einem Fluorimeter bei 360 nm angeregt und das Signal ebenfalls bei 360 nm detektiert.

[0062] In Fig. 7 ist das Aggregationsverhalten von rPA während thermischer Denaturierung dargestellt (gefüllte Kreise Vol.-0%, gefüllte Dreiecke 5 Vol.-%, offene Kreise 12 Vol.-%, offene Dreiecke 20 Vol.-% 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat). Die Aggregation von rPA in Abwesenheit von 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat setzt bei 55°C ein. In Gegenwart von 5 Vol.-% 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat ist eine verstärkte Aggregation erst oberhalb von 80°C zu beobachten, bei höheren 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat-Konzentrationen tritt bis 90°C keine messbare Aggregation auf.

## Beispiel 9

## Renaturierung von rPA mit 3-(1-Pyridinio)-1-propansulfat (Vergleichsbeispiel)

[0063] Die Renaturierung des in 6 M Guanidin, pH 2 befindlichen rPA erfolgt durch eine 1 : 100 Verdünnung in 0,1 M Tris, pH 10,5, 1 mM EDTA, 5 mM GSSG, 2 mM GSH in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von 3-(1-Pyridinio)-1-propansulfat. Die Renaturierung wird für mindestens 16 h bei 10°C durchgeführt. Nach der Renaturierung werden die Proben gegen das 1000fache Volumen von 0,1 M Tris, pH 8, 1 mM EDTA über Nacht dialysiert. Als Maß der Renaturierung wird die Enzymaktivität von rPA mit Hilfe des Chromozym-tPA-Assays (Roche Diagnostics) ermittelt und anhand einer Eichgerade für das native rPA quantifiziert.

[0064] In Fig. 8 ist die Renaturierungsausbeute von rPA in Abhängigkeit von der Konzentration des Salzes 3-(1-Pyridinio)-1-propansulfat dargestellt. Die maximale Renaturierungsausbeute liegt bei 18% in Gegenwart von 30 Vol.-% 3-(1-Pyridinio)-1-propansulfat.

## Beispiel 10

## Renaturierung von rPA mit Trigonellin-Hydrochlorid (Vergleichsbeispiel)

[0065] Die Renaturierung des in 6 M Guanidin, pH 2 befindlichen rPA erfolgt durch eine 1 : 100 Verdünnung in 0,1 M Tris, pH 10,5, 1 mM EDTA, 5 mM GSSG, 2 mM GSH in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von Trigonellin-Hydrochlorid. Die Renaturierung wird für mindestens 16 h bei 10°C durchgeführt. Nach der Renaturierung werden die Proben gegen das 1000fache Volumen von 0,1 M Tris, pH 8, 1 mM EDTA über Nacht dialysiert. Als Maß der Renaturierung wird die Enzymaktivität von rPA mit Hilfe des Chromozym-tPA-Assays (Roche Diagnostics) ermittelt und anhand einer Eichgerade für das native rPA quantifiziert.

[0066] In Fig. 9 ist die Renaturierungsausbeute von rPA in Abhängigkeit von der Konzentration des Salzes Trigonellin-Hydrochlorid dargestellt. Es ist keine verbesserte Renaturierung von rPA in Gegenwart des Salzes zu beobachten.

1. Verwendung von substituierten Imidazoliumsalzen zur Renaturierung, zur Erhöhung der thermischen Stabilität und/oder zur Verminderung der Aggregation von Proteinen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Imidazoliumsalze durch Alkyl-, Alkenyl-, Aryl- und/oder Aralkyl-Reste substituiert sind, welche wiederum durch funktionelle Gruppen substituiert sein können, bevorzugt durch Stickstoff-, Schwefel-, und/oder Phosphor-haltige Gruppen.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Imidazoliumsalze an beiden Stickstoffatomen des Imidazoliumrings substituiert sind.
4. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Imidazoliumsalze an einem oder mehreren der Kohlenstoffatome des Imidazoliumrings substituiert sind.
5. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Imidazoliumring als Substituenten C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkylreste, bevorzugt Methyl-, und/oder Ethylreste, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkenylreste und/oder mono- oder bicyclische Arylreste aufweist.
6. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Imidazoliumring an mindestens einem der N-Atome einen Methylrest aufweist.
7. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Imidazoliumring einen oder mehrere der nachfolgenden Substituenten aufweist: Phenol, Biphenyl, Biphenol, Naphthalin, Naphthalincarbonsäuren, Naphthalinsulfonsäuren, Biphenylol, Biphenylcarbonsäuren, Phenol, Phenylsulfonat, Phenolsulfonsäuren und/oder substituiertes oder unsubstituiertes Benzyl.
8. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Substituenten weiterhin durch ein oder mehrere der nachfolgenden Reste substituiert sind: Amine, Carboxyl-, Carbonyl-, Aldehyd-, Hydroxy-, Sulfat-, Sulfonat- und/oder Phosphat-Reste.
9. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Imidazoliumsalzen um bei Raumtemperatur ionische Flüssigkeiten handelt.
10. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, zur Renaturierung, Erhöhung der thermischen Stabilität und/oder Verminderung der Aggregation von:
  - Proteasen, bevorzugt Serin-Proteasen, insbesondere Thrombin, Faktor Xa, Caspasen, Cathepsine, Trypsin und/oder Chymotrypsin, Cystein-Proteasen, sauren Proteasen, wie Pepsin oder Rennin, Metallo-Proteasen, wie Thermolysin;
  - Protease-inhibitoren, bevorzugt Pepstatine, Antipain, Chymostatine, Elastinal, Leupeptine, Bestatin, Antithrombin III;
  - DNA-bindenden Proteinen, bevorzugt Transkriptionsfaktoren; insbesondere NF Kappa B und Mitglieder der Familien Jun, Fos, Krox, Myc, 122F und/oder virale T-Antigene;
  - virale Proteine, wie virale Hüllproteine, Kapsidproteine, virale Proteasen, Polymerasen und/oder T-Antigene;
  - Phosphatasen;

Proteinkinasen, bevorzugt Tyrosinkinasen und/oder Serinkinasen;  
 Proteinen der Immunglobulin-Superfamilie, z. B. Antikörper und Fragmente hiervon;  
 Wachstumsfaktoren, bevorzugt epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), Erythropoietin, Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren I und II (IGF I und IGF II), Interleukin-2 (IL-2), Nervenwachstumsfaktor (NGF), transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und/oder Thrombocyten-Wachstumsfaktor (PDGF);  
 Lysozym, rPA, alpha-Glucosidase sowie von diesen Proteinen abgeleitete Proteine und Fragmente.  
 11. Verfahren zur Renaturierung, Erhöhung der thermischen Stabilität und/oder Verminderung der Aggregation von Proteinen, dadurch gekennzeichnet, dass die zu behandelnden Proteine mit einem flüssigen Medium, welches substituierte Imidazoliumsalze enthält, in Kontakt gebracht werden.  
 12. Verfahren nach Anspruch 11 zur Renaturierung von Proteinen, wobei als flüssiges Medium ein flüssiges Renaturierungsmedium eingesetzt wird.  
 13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass als flüssiges Medium ein für das zu behandelnde Protein geeignetes Puffersystem eingesetzt wird.  
 14. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-13, dadurch gekennzeichnet, dass als Puffer-substanzen Tris, HEPES, Mes, Mops, Acetat, Glycin und/oder Phosphat eingesetzt werden.  
 15. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-14, dadurch gekennzeichnet, dass die Pufferkonzentration in dem flüssigen Medium 10 bis 1000 mM beträgt, bevorzugt 5-200 mM, noch bevorzugter 10-50 mM.  
 16. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-15, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert des Puffersystems 4-11, bevorzugt 7, 5-10,5 beträgt.  
 17. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-16, dadurch gekennzeichnet, dass die Imidazoliumsalze Alkyl-, Alkenyl-, Aryl- und/oder Aralkyl-Reste substituiert sind, welche wiederum durch funktionelle Gruppen substituiert sein können, bevorzugt durch Stickstoff-, Schwefel-, und/oder Phosphorhaltige Gruppen.  
 18. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-17, dadurch gekennzeichnet, dass die Imidazoliumsalze an beiden Stickstoffatomen des Imidazoliumrings substituiert sind.  
 19. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-18, dadurch gekennzeichnet, dass die Imidazoliumsalze an einem oder mehreren der Kohlenstoffatome des Imidazoliumrings substituiert sind.  
 20. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-19, dadurch gekennzeichnet, dass der Imidazoliumring als Substituenten C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkylreste, bevorzugt Methyl-, und/oder Ethylreste, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkenylreste und/oder mono- oder bicyclische Arylreste aufweist.  
 21. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-20, dadurch gekennzeichnet, dass der Imidazoliumring an mindestens einem der N-Atome einen Methylrest aufweist.  
 22. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-21, dadurch gekennzeichnet, dass der Imidazoliumring einen oder mehrere der nachfolgenden Substituenten aufweist: Phenol, Biphenyl, Biphenol, Naphthalin, Naphthalincarbonsäuren, Naphthalinsulfonsäuren, Biphenylol, Biphenylcarbonsäuren, Phenol, Phe-

nylsulfonat, Phenolsulfonsäuren und/oder substituiertes oder unsubstituiertes Benzyl.  
 23. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-22, dadurch gekennzeichnet, dass die Substituenten weiterhin durch ein oder mehrere der nachfolgenden Reste substituiert sind: Amino-, Carboxyl-, Carbonyl-, Aldehyd-, Hydroxy-, Sulfat-, Sulfonat- und/oder Phosphat-Reste.  
 24. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-23, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Imidazoliumsalzen um bei Raumtemperatur ionische Flüssigkeiten handelt.  
 25. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-24, dadurch gekennzeichnet, dass das Inkontaktingen erfolgt, indem das zu behandelnde Protein mit dem flüssigen Medium verdünnt, dialysiert und/oder diafiltriert wird.  
 26. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-25, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteinkonzentration des zu behandelnden Proteins beim Inkontaktingen 5-500 µg/ml, bevorzugt 10-200 µg/ml, noch bevorzugter ungefähr 50-100 µg/ml, beträgt.  
 27. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-26, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration an substituierten Imidazoliumsalzen, bezogen auf das flüssige Medium, 5-95 Vol.-% beträgt, bevorzugt 5-50 Vol.-%, am bevorzugtesten 10-40 Vol.-%.  
 28. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-27, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren durchgeführt wird, indem das zu renaturierende Protein dem Renaturierungsmedium mehrfach nacheinander oder kontinuierlich zugeführt wird.  
 29. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-28, dadurch gekennzeichnet, dass das Inkontaktingen der zu renaturierenden Proteine mit dem Renaturierungsmedium für 0,1-100 h, bevorzugt, 1-50 h, noch bevorzugter 5-20 h erfolgt.  
 30. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-29, zur Renaturierung, Erhöhung der thermischen Stabilität und/oder Verminderung der Aggregation von:  
 Proteasen, bevorzugt Serin-Proteasen, insbesondere Thrombin, Faktor Xa, Caspasen, Cathepsine, Trypsin und/oder Chymotrypsin, Cystein-Proteasen, sauren Proteasen, wie Pepsin oder Rennin, Metallo-Proteasen, wie Thermolysin; Protease-inhibitoren, bevorzugt Pepstatine, Antipain, Chemostatine, Elastinal, Leupeptine, Bestatin, Antithrombin III;  
 DNA-bindenden Proteinen, bevorzugt Transkriptionsfaktoren; insbesondere NF Kappa B und Mitglieder der Familien Jun, Fos, Krox, Myc, E2F, virale T-Antigene; virale Proteine, wie virale Hüllproteine, Kapsidproteine, virale Proteasen, Polymerasen und/oder T-Antigene;  
 Phosphatasen;  
 Proteinkinasen, bevorzugt Tyrosinkinasen und/oder Serinkinasen;  
 Proteinen der Immunglobulin-Superfamilie, z. B. Antikörper und Fragmente hiervon;  
 Wachstumsfaktoren, bevorzugt epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), Erythropoietin, Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren I und II (IGF I und IGF II), Interleukin-2 (IL-2), Nervenwachstumsfaktor (NGF), transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und Thrombocyten-Wachstumsfaktor (PDGF);  
 Lysozym, rPA, alpha-Glucosidase sowie von diesen Proteinen abgeleitete Proteine und Fragmente.

31. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-30, dadurch gekennzeichnet, dass disulfidfreie Proteine renaturiert werden, wobei das Inkontaktbringen des disulfidfreien Proteins mit dem Renaturierungsmedium in Gegenwart eines Reduktionsmittels 5 erfolgt, vorzugsweise DTT, DTE und/oder Cystein.
32. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-30, dadurch gekennzeichnet, dass disulfidverbrückte Proteine renaturiert werden, wobei das Inkontaktbringen des disulfidverbrückten Proteins mit dem 10 Renaturierungsmedium in Gegenwart eines Redoxsystems aus oxidierten und reduzierten Thiolsubstanzen wie DTT, DTE, Glutathion, Cystein und/oder Mercaptoethanol erfolgt.
33. Verfahren nach Anspruch 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, dass das Konzentrationsverhältnis von 15 reduzierten Substanzen zu oxidierten Substanzen 1 : 10 bis 20 : 1, bevorzugt 1 : 5 bis 10 : 1, weiterhin bevorzugt 1 : 1 bis 5 : 1, beträgt.
34. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11-33, dadurch gekennzeichnet, dass das flüssige Medium zur Renaturierung von Proteinen weitere Renaturierungssubstanzen enthält, bevorzugt Harnstoff, Guanidin, L-Arginin, Alkylharnstoff, Carbonsäureamide, alkylierte Amine, Tris-Puffer, Polyethylenglykol 25 und/oder Detergenzien.
35. Renaturiertes Protein, hergestellt nach einem Verfahren der Ansprüche 11-34.

---

Hierzu 9 Seite(n) Zeichnungen

---

30

35

40

45

50

55

60

65



Fig. 1

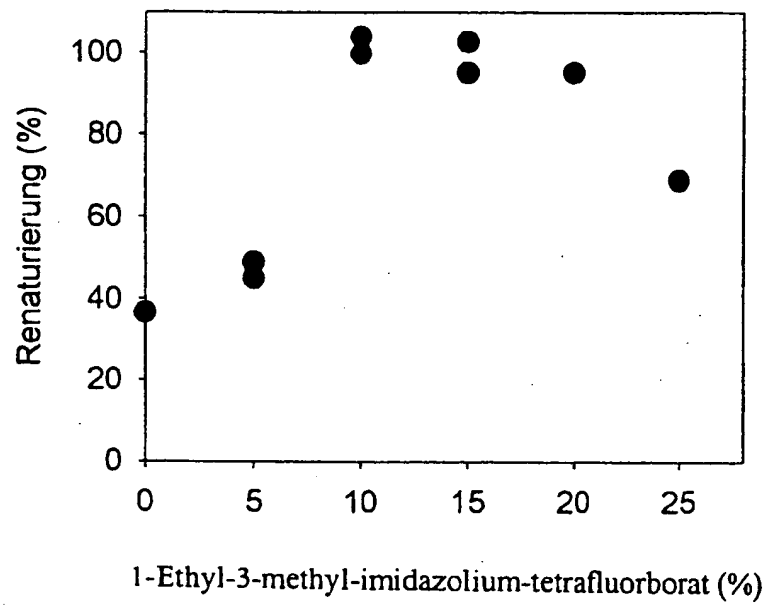


Fig. 2

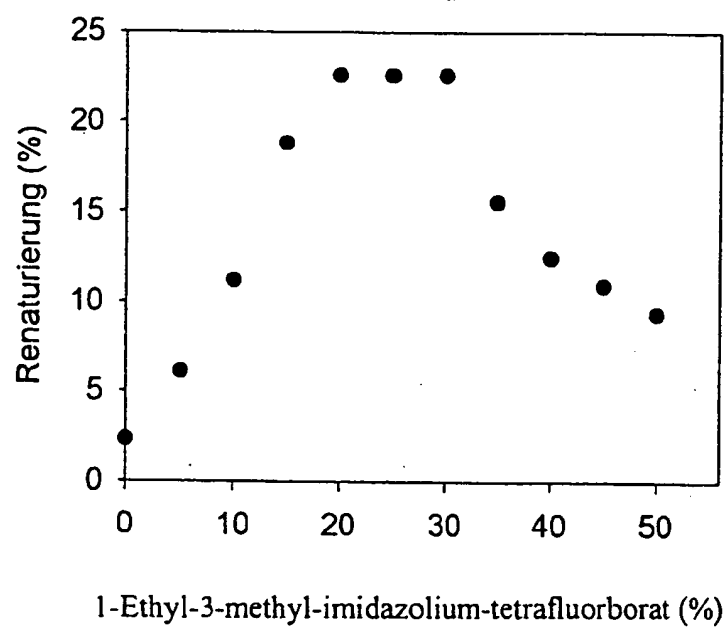


Fig. 3

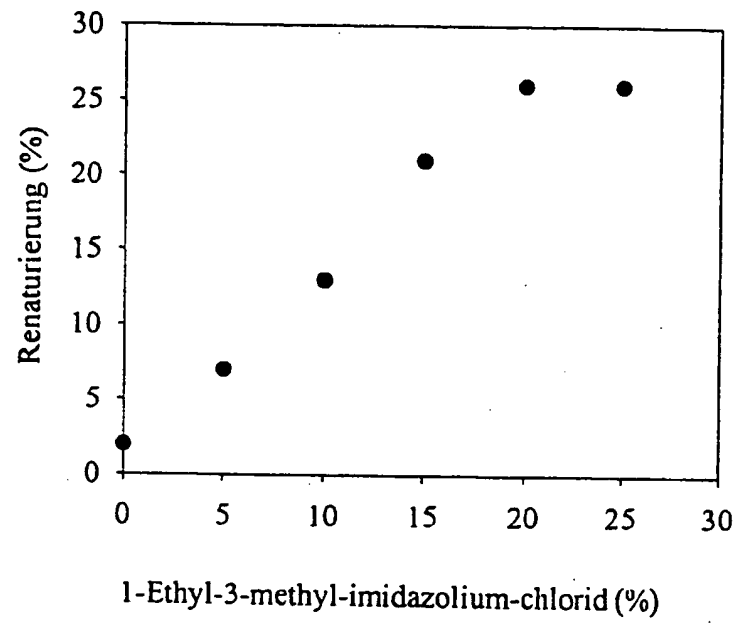


Fig. 4

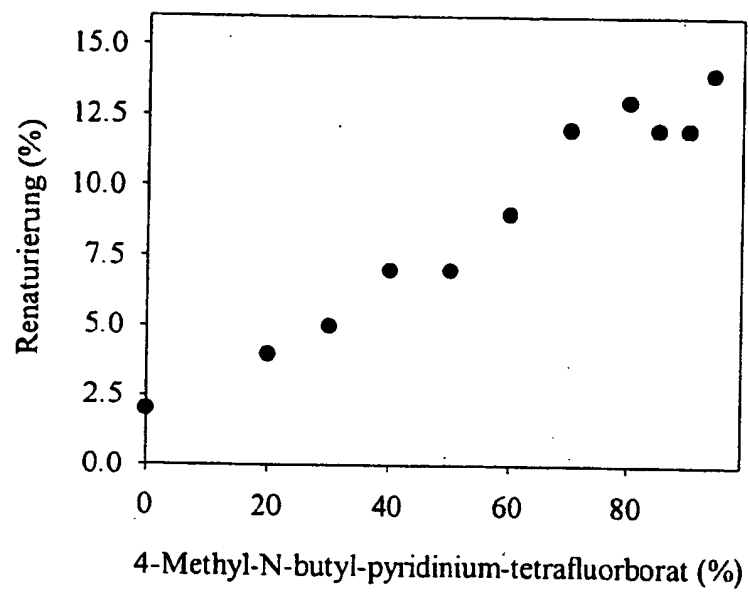


Fig. 5

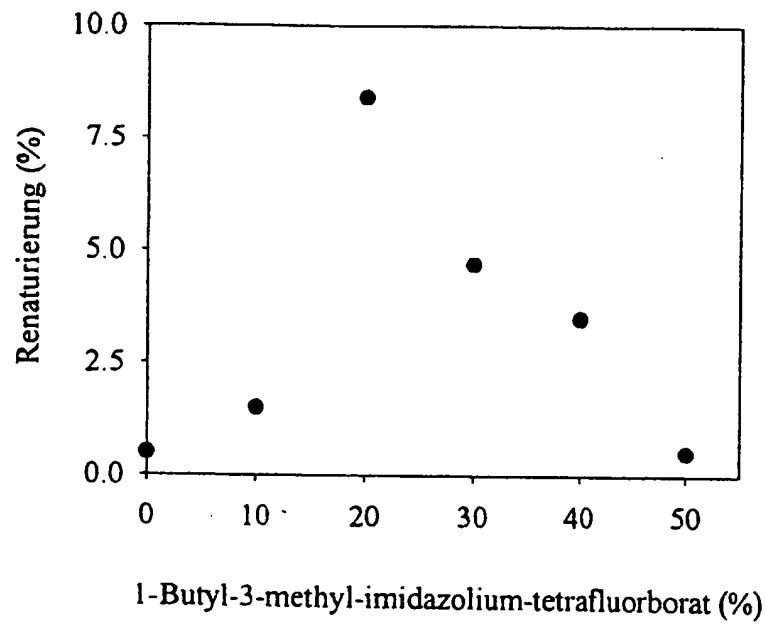


Fig. 6

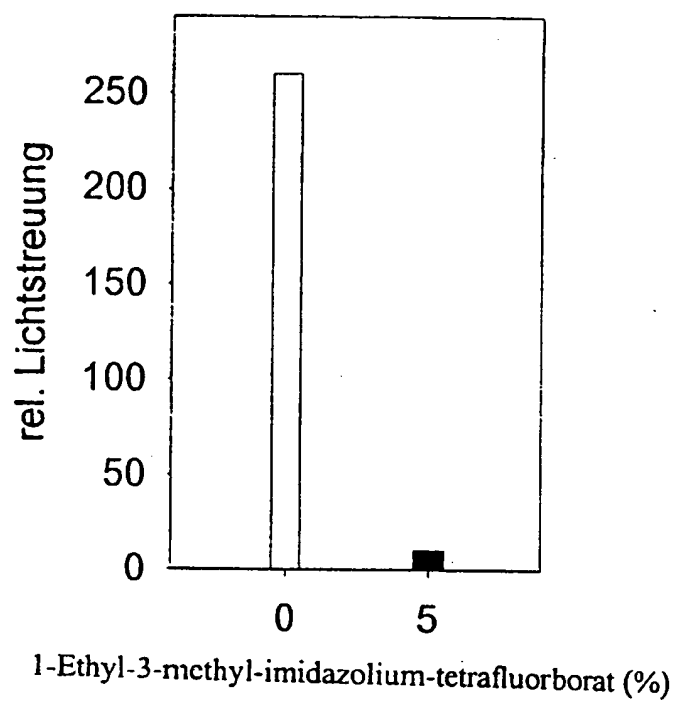


Fig. 7

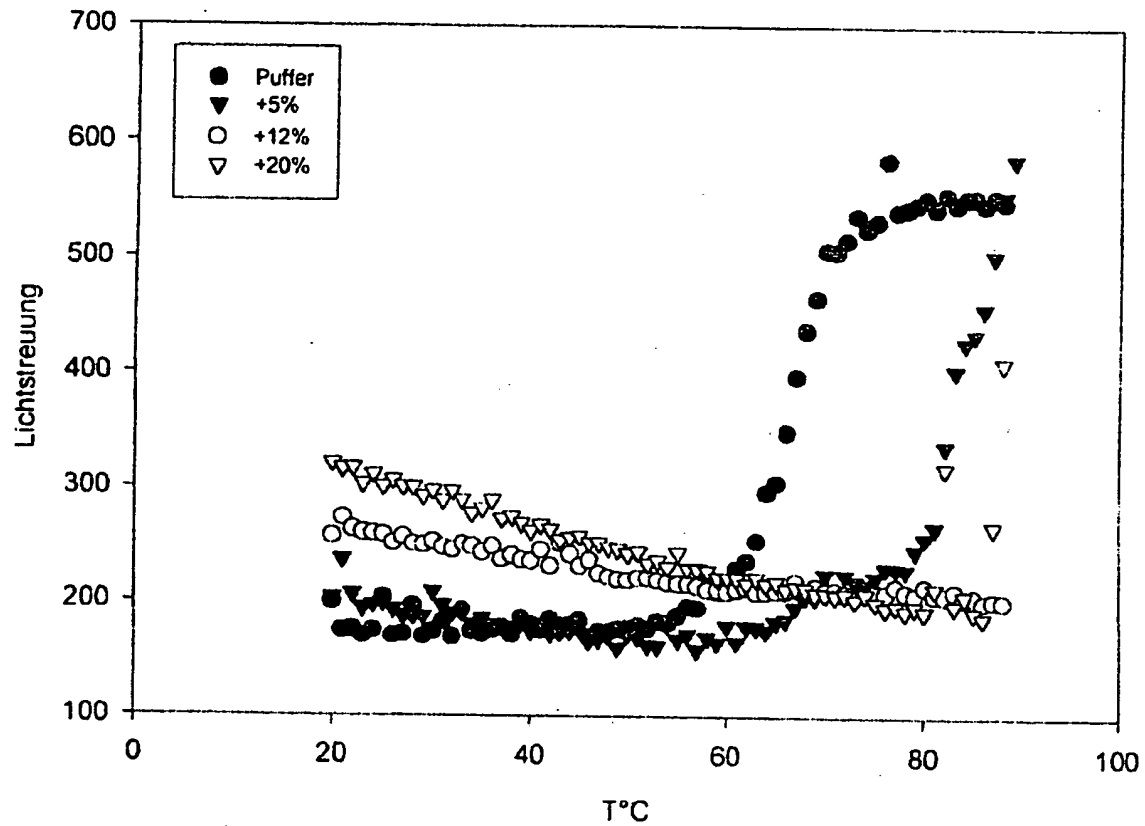


Fig. 8

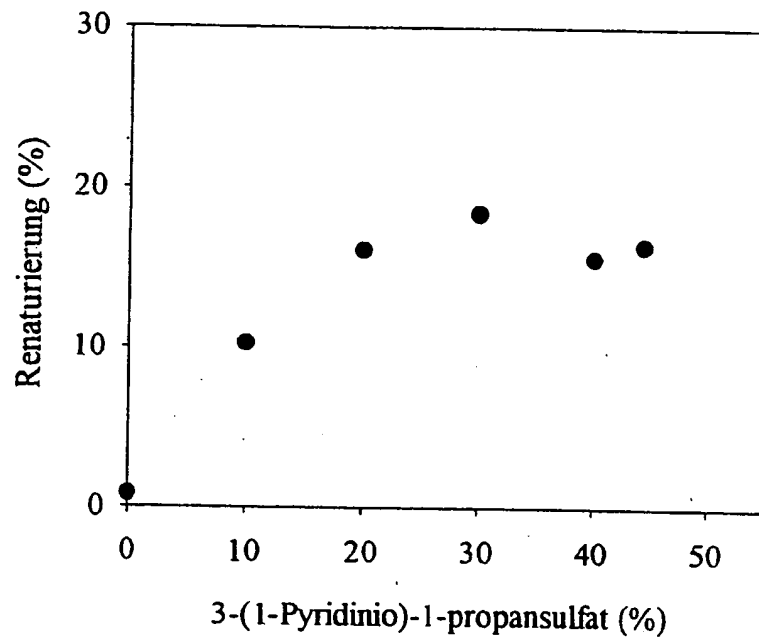
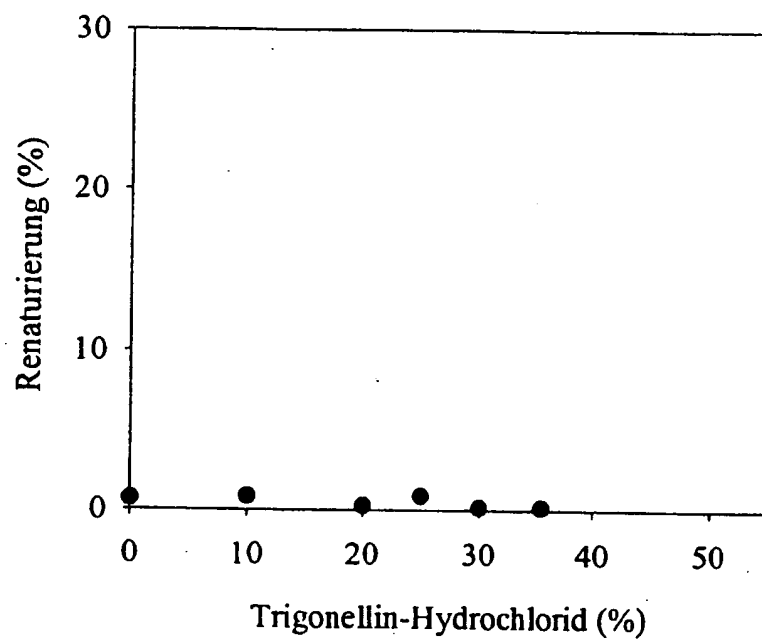




Fig. 9



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**